

学校编码: 10384

分类号: 0658.9

密级:

学 号: B952501

UDC:

厦门大学理学博士学位论文

制备型逆流聚焦电泳方法的研究

周勇亮

指导教师: 田昭武教授

申请学位级别: 博士

专业名称: 物理化学

论文提交日期: 1998.12

论文答辩日期: 1998.12

学位授予单位: 厦门大学

答辩委员会主席:

评阅人:

1998 年 12 月

Studies on Preparative Counter Flow
Focusing Electrophoresis

A Thesis submitted for the Doctoral Degree
of Philosophy at Xiamen University

by
Yong-Liang Zhou

Directed by Prof. Zhao-Wu Tian

Department of Chemistry, Xiamen University

December, 1998

摘 要

分离技术对于分析测试和许多生产过程来说,是至关重要的。一个好的分离方法不仅可以提高分析水平或产品质量,而且可以节省仪器设备的投入,提高工作速度,大大降低生产成本。现代科学技术和生产的发展,对分离技术不断提出越来越高的要求。目前特别急需的是分辨率高且有浓缩效应的分离技术。

电泳技术条件温和,分辨率高,广泛应用于生物、医药等广大领域。但是现存的各种电泳技术各具弊端,区带电泳不具有浓缩效应,等电聚焦电泳只适用于两性电解质,毛细管电泳容量太小。目前的研究大多是在原有的电泳模式的基础上进行一些改进,未能解决根本问题。逆流聚焦电泳是一种完全不同于已有任何形式的电泳,根据电泳迁移率的不同将离子聚焦在相应的位置,分辨率高,有浓缩效应,因此适于制备性分离。本论文根据逆流聚焦电泳的原理设计和组装了一系列(不同类型、不同规模)制备型逆流聚焦(PCFF)电泳装置,并进行了初步的分离实验。主要内容如下:

1. 从理论上分析了逆流聚焦电泳的理论依据,并对两种模型(连续梯度模型和两段式模型)进行了动力学分析,推导了速度方程、聚焦范围和聚焦时间方程。
2. 设计和组装了薄膜 PCFF 电泳装置。并利用装置进行了溴酚兰、酚红和辣根过氧化物酶(HRP)的聚焦实验以及溴酚兰和酚红混合物的分离实验,取得了很好的结果。与常规薄膜电泳相比,PCFF 薄膜电泳分辨率高,分离时间短,容易小型化,可以应用于临床的一些生物化学检测以及其他领域的快速检测。
3. 设计和组装了两种自由溶液 PCFF 电泳装置(细管型和哑铃型),并利用装置进行了溴酚兰、血红蛋白和 HRP 的聚焦实验以及血红蛋白和 HRP 混合物的分离实验,取得了很好的结果。与现有的自由溶液电泳相比,自由溶液 PCFF 电泳分辨率高,设备简单,不需要特殊的试剂,应用范围广,可连续分离,可以应用于生物、医药、临床等广泛领域以及实验室进行较小规模的制备分离。
4. 设计和组装了两种填充柱 PCFF 电泳装置(垂直型和水平型),并利用装置进行了氨基黑、溴酚兰、血红蛋白和 HRP 的聚焦实验以及血红蛋白和 HRP 混合物的分离实验,取得了很好的结果。填充柱 PCFF 电泳既具有凝胶等电聚焦电泳分辨率高的优点,又具有凝胶区带电泳应用范围广的优点,同时没有逆流色谱电泳的色谱介质的问题,而且初步解决了焦耳热问题,是一种非常好的分离技术,可以广泛应用于生物、化工、医药等领域的大规模制备和分离提纯。

中 文 摘 要

Abstract

Separation technique plays key role both in analytical test and many production processes. Good methods of separation not only improve the analysis standard or the quality of product, but also save the input for equipment and raise the work efficiency, which eventually lead to great reduction of the production cost. With the development of science and technology, more and more demands have been raised for separation technique. Separation technique of high resolution and with concentration enrichment is indeed desirable at present.

Working under mild condition but with high resolution, the electrophoresis has been widely applied to biology and pharmaceuticals and other areas. However, the present existed electrophoresis techniques have drawbacks of one or another. For example, zone electrophoresis has no concentration effect, isoelectric focusing electrophoresis is only applicable to ampholyte, and the throughput of capillary electrophoresis is too small. Moreover, a common and intrinsic shortage of these techniques is the Joule heat problem which restricts the scale-up of the system. Though grate efforts have been devoted to solve the problem base on the original electrophoresis mode, the fundamental problem remains untackled. Counter flow focusing electrophoresis is a new type of electrophoresis, which differs completely from any existing type. Ions can be focused at the corresponding locations in accordance with their effective electrical mobilities. High resolution, concentration effect and good heat dissipation can be achieved. Therefore it is suitable for preparative separation. In this thesis, a series of apparatus of different types and scales for preparative counter-flow focusing electrophoresis (PCCF) have been designed and set up and the preliminary separation experiments have been performed. The following is the main content:

1. The principle of counter-flow focusing electrophoresis has been theoretically analyzed for two models (linear gradient model and two-section model) from dynamics point of view.
2. The film for PCCF apparatus has been designed and set up. And the focus experiment with Bromphenol Blue, Phenol Red and Horseradish peroxidase (HRP) and the separation experiment with the mixture of Bromphenol Blue and Phenol Red have been made. Good results were obtained. In comparison with the conventional film electrophoresis, PCCF film electrophoresis has better resolution and consumes shorter time for separation. Furthermore, since it is easy to be miniaturized, it would be applicable for clinical biochemical inspections and other areas demanding quick inspections of samples of several microgram quantities.
3. Two types of free solution PCCF electrophoresis apparatus (tube type and dumbbell type) have been designed and set up. With the

apparatus, the focusing experiments with Bromphenol Blue, hemoglobin and HRP has been performed, and good results have also been obtained. In Comparison with the current free solution electrophoresis, free solution PCCF electrophoresis has the advantages of better resolution, non-sophisticated equipment, no need for special reagent and allows for continuous separation.. It can be applied for small-scaled production separation of broad areas such as biology, pharmaceuticals, and clinic.

4. Two types of packing PCCF electrophoresis apparatus (vertical type and horizontal type) have been designed and set up. With the apparatus, the focus experiments with Amido Black 10B, Bromphenol Blue, hemoglobin and HRP and the separation experiments with hemoglobin and HRP have been performed with good results . The packing PCCF electrophoresis bears both the advantages of the high resolution of IGF electrophoresis and the wide applicability of gel zone electrophoresis but with no chromatographic medium problem in counter chromatographic electrophoresis. The most important thing is that it solves the Joule heat problem to great extent. The superiority of the PCCF electrophoresis will make it applicable for large-scale production, separation and purification in many areas such as biology, chemical industry and pharmaceuticals, and so forth.

Óç îÄ Õª Òª

-viii-

目 录

中 文 摘 要	i
英 文 摘 要	iii
第 一 章 绪 论	1
第 一 节 分 离 的 定 义 和 意 义	1
第 二 节 主 要 分 离 方 法	4
第 三 节 逆 流 聚 焦 电 泳 和 相 关 技 术	18
第 四 节 本 论 文 的 目 的 与 设 想	25
第 二 章 理 论 依 据 与 模 型 分 析	27
第 一 节 逆 流 聚 焦 电 泳 的 理 论 依 据	27
第 二 节 模 型 分 析	30
第 三 章 实 验 设 备 与 试 剂	38
第 四 章 薄 膜 PCFF 电 泳	40
第 一 节 常 规 薄 膜 电 泳	40
第 二 节 薄 膜 PCFF 电 泳 的 装 置 及 设 计 思 路	42

第 三 节 实 验 及 结 果 与 讨 论	
论	46
第 四 节 评 价 及 展 望	
望	52
本 章 小 结	
结	53
第 五 章 自 由 溶 液 PCFF 电 泳	
泳	54
第 一 节 绪 论	
论	54
第 二 节 自 由 溶 液 PCFF 电 泳 的 装 置 及 设 计 思 路	
路	56
第 三 节 实 验 及 结 果 与 讨 论	
论	62
第 四 节 评 价 与 展 望	
望	72
本 章 小 结	
结	74
第 六 章 填 充 柱 PCFF 电 泳	
泳	75
第 一 节 绪 论	
论	75
第 二 节 填 充 柱 PCFF 电 泳 的 装 置 及 设 计 思 路	
路	77
第 三 节 实 验 及 结 果 与 讨 论	
论	82
第 四 节 评 价 与 展 望	
望	89
本 章 小 结	
结	

..... 90

作者攻读博士学位期间发表与交流的论文..... 91

致

谢.....

..... 93

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 绪论

第一节 分离的定义与意义

"分离"一词的含义是不言而喻的。Rony 曾提出这样的定义[1]：“分离(separation)是一种假设的状态，在这种状态下，物质被完全分开(isolated)了，就是说，含有 m 种化学组分的混合物被分隔成 m 个常量范围。换言之，任何分离过程的目的就是要把 m 个化学组分分隔成 m 种纯的形式，并把它们置于 m 个独立的容器中(如玻璃瓶或聚乙烯瓶)。”在这里用了一个形容词“假设的(hypothetical)”，是因为从理论上讲，把一个混合物的组分进行完全的分离是不可能的。所谓已被分离的化合物或组份实际上并没有完全的分开。即使是六个九的硅(即纯度为 99.9999%)，也意味着含有 0.0001%(即 1ppm)的其他组份。分离过程大致有两种情况，即组分离??把性质相近的组份一起分离；单一分离??把某一组份以纯物质形式分离。工业上的纯物质的分离提取、分析化学上的纯基体的制备或某一组份的分离分析均属后者[2]。

分离技术的发展往往有利地推动了化学、化工技术和生命技术的发展。例如石油化学工业的迅速发展是和气相色谱分离技术的发展和运用密切有关的。解决了 ^{235}U 和 ^{238}U 的分离问题，对于人类进入原子能时代起了极大的推动作用。现代最活跃的、发展迅速的是生命科学，可是生命科学的发展是和各种色谱、电泳等分离方法的发展和运用密切联系在一起的，要不是各种色谱电泳分离方法的发展和运用，蛋白质化学、分子生物学等的现代发展是不可能的；各种天然产物，如甾类化合物、萜烯类化合物、激素、维生素等等的研究同样也是不可能的。目前，分离和纯化过程已经几乎渗透到了所有的工业和研究领域，特别是在水法冶金、生化后处理、高纯或超纯材料制备、环境保护和资源综合利用等领域中分离过程更是具有举足轻重的地位。表 1.1[3]按分离过程的基本类别列出了有关工业领域中分离和纯化过程的应用示例。在化工工业中分离方法的效率通常是生产成本的主要因素，这个

表 1.1 分离过程的类别和应用(引自文献[3])

工业领域

分 离 过 程 类 别

从固体基体中溶解

从稀溶液中浓集

纯化

分离

通过分离进行化学分析

生物工艺/药物

从细胞中回收溶质

从稀发酵液中回收产品

人工肾去除有毒物质

从副产物中分离产品

营养素、有毒组分的分析

微电子学

水废物的再循环

从 Si, Ge, 砷化物中去除杂质

从混合物氯化硅烷中获取三氯硅烷
为了分析反应物纯度进行预浓缩
塑料

溶剂和反应单体的去除

单体的制备

聚合物产品的分离

测定单体的纯度

金属

浸出:地下或从尾矿

浸出

从稀溶液回收有价值金属

矿物杂质

的去除

从矿物中获取金属,如 Cu、Au...

选择性萃取剂

污染控制

煤中脱硫

从排气中回收硫

空气净化

从天然气中除去 H₂S

PCBS 的分离

饮水供应

淡化,灌溉回水的净化

使杂质达到允许检测水平的预浓缩

食品处理

饮料的提取,如咖啡和茶

果汁的浓缩

微量黄曲霉素、棉醇的去除

高果糖玉米

维生素和营养剂的分析

矿物燃料

从油页岩和焦油砂中回收油

从煤气洗水中脱酚

从汽油中去除 S、N

将粗油分成不同沸程的馏分

气相和液相色谱

核能

燃料棒的选择性溶解

减小放射性废物的体积

铀 235 的制备

从长寿命放射性废物中分离短寿命废物

探测废物

储存

日用化学

制品

催化剂再生

乙二醇回收

无水乙醇

的生产

异构体的分离

质量控制

化肥(氨和磷酸盐)

从矿石中提取磷酸盐

矿泥的处理

最终产物的

净化

无水氨的生产

检测产品

纯度

纸浆和纸

去木质

黑液的浓缩

从排出液中去除污染物

纸浆化学制品的分离

检测排出液

成本包括实现分离所需的仪器的组成, 能量以及时间。在生物技术领域, 把终产物从稀的水溶液中分离出来是生产的关键部分; 在战略金属冶炼领域, 大多数矿是稀矿, 矿石含量很低且伴随必须除去的废物; 在污水处理方面, 由于排污标准降低了, 从稀溶液中除去污染物就越发显得重要。

近年来, 人们越发认识到了分离和纯化过程在工业过程中的重要性, C.J.King 等[4] 13 位专家在向美国政府提交的报告中指出 " 分离科学和技术的研究进展对于保持和提高美国在一系列领域内的经济竞争力是至关重要的 ", 这对于我国也同样如此。目前, 分离科学研究的主要问题是(1) 提高生产技术, (2) 界面现象, (3) 分离的速度和容量, (4) 能量效率[5]。分离系统过程的复杂性直接关系着设备的大小与容量。通常分离设备的成本占整个工厂成本的一大部分, 因此任何分离效率的改进都会大大降低终产品的价格。无论是小规模还是大规模的分离, 其速度和分离容量都与许多参数有关。界面现象在很多分离过程中影响分离速度, 因为存在表面活性化合物, 这些化合物通过改变界面的结构或是改变流体的迁移率而改变分离的程度和速度。分离过程的能耗通常是给系统加热或是降温, 一般而言, 有相变过程(如蒸馏等)比无相变过程(如电泳等)能耗要大得多。另外, 把分离技术转化成商业用途需要发展创新的分离技术, 并进行设计, 将之放大。

参考文献

[1] P. R. Rony, Separ. Sci. 3, p239 (1968)

- [2] 化学分离富集方法及应用, 周春山主编, 中南工业出版社, p2, (1997)
- [3] 李洲, 化工进展, Vol.1 , p17 (1993)
- [4] C. J. King, Separation & Purification? Critical Needs and Opportunities? National Academy press, Washington D.C., (1987)
- [5] C. S. Grant, Separation and purification methods, 22(1), p55 (1993)

- [1] P.R.Rony, Separ. Sci.3, 239(1968)
 - [2] 化学分离富集方法及应用, 周春山主编, 中南工业出版社, 2, (1997)
 - [3] 李洲 化工进展, Vol.1 , p17(1993)
 - [4] C.J.King Separation & Purification? Critical Needs and Opportunities? National Academy press, Washington D.C., (1987)
 - [5] C.S.Grant, Separation and purification methods, 22(1), 55 (1993)
- 厦门大学理学博士论文

周 勇 亮

第一章 绪 论

- 2 -

- 1 -

第二节 主要分离方法

近年来，分离方法和技术的研究发展很快。分离技术领域的实践和理论研究都在不断取得新进展，已经形成一门学科——分离科学，且有专门的杂志。分离的方法有非常多种，分离方法的分类有许多不同的方式，主要有按相的类型分(表 1.2)，按推动力类型分(表 1.3)，按过程的类型分(表 1.4)等等[1]。每一种分类方法都有一个值得考察的观点，这种观点有助于强调方法之间的相似性和差异性。但是，必须指出，这些分类法都是不严格的，留有解释的余地。本文不可能也不必要一一详细介绍，而只是对一些重要的分离方法进行简要的介绍。

表 1.2 按相的类型分类的分离方法(引自文献[1])

初始相

第二相

气 体

液体

固体

气体

热扩散

气-液色谱

气-固色谱

液体

蒸馏、挥发

液-液色谱

液-固色谱

液-液萃取

沉淀法

渗析

电沉积

超过滤

结晶

自由溶液电泳

包结化合物

(区带电泳)

环炉
固体
升华
区域熔融
选择性溶解

表 1.3 按推动力类型分类的某些分离方法(引自文献[1])

平 衡
动力学
色 谱
渗 析
蒸 馏
区带电泳
萃 取
扩散、热扩散
区域精炼
离心和超离心
升 华
超 过 滤
沉 淀

表 1.4 按过程类型分类的分离方法(引自文献[1])

机 械 的
物 理 的
化 学 的
过筛和排斥(大小):
分配:
状态变化:
渗析
气-液色谱
沉淀
排阻色谱
液-液色谱
电沉积
包含化合物形成
气-固色谱
掩蔽(假分离)
过滤和超过滤
液-固色谱
离子交换
离心(密度)

液-液萃取

区带电泳

泡沫分馏

状态变化:

蒸馏

升华

结晶

区域精炼

蒸馏 蒸馏是基于气-液平衡的原理将物质的组份分开,开始时只有一个液相,该相中含有一些挥发性组分。当把它加热时,形成了第二相,该相是富集了挥发组份的蒸汽相,当蒸汽冷凝时,挥发性组分在冷凝液中得到了富集,因而可根据组分的挥发性来实现分离。这种冷凝液叫馏出液,残留下来未蒸馏的(难挥发)液体叫做回流液。

为了提高蒸馏的效率,可采用分馏柱来增加液体和蒸汽之间的接触。当蒸汽在柱中上升时,与柱接触的蒸汽中有一些被冷凝下来,并从柱中流下,于是发生了平衡,结果易挥发的组分在馏出液中得到了富集。这类蒸馏叫作分馏,它是实验室中主要的蒸馏方法。

蒸馏的理论比较成熟,可以用塔板理论很好地解释,Weissberger[2]曾对此作过详细的叙述。对于一个有 n 个理论塔板的分馏柱来说,它的分离结果可用 Fenske 方程来表示。实际的蒸馏都是在部分回流的情况下进行的,描述部分回流蒸馏的方法有两种,一种是 McCabe(Thiele 图解法,它是根据 Lewis 的“操作曲线方程”而得,适用于连续蒸馏;另一种是适用于间断蒸馏的 Rayleigh 方程,可用于测定蒸馏过程中蒸馏瓶内液体的组成。除了常规的蒸馏方法外,蒸馏方法还有使用夹带剂的恒沸点混合物蒸馏法,真空蒸馏法、水蒸气蒸馏法等。

蒸馏法简单易行,但选择性不好,不适用于热稳定性差的化合物,涉及相变,能耗较大。在实验室中,蒸馏是筛选液体混合物和制备大量纯液体最有用的方法。蒸馏能够得到很纯的样品,但是要把非常复杂的混合物分离成单个的组分很少使用蒸馏法。蒸馏法的一个比较普遍的用途是把石油(原油)分成一定沸点范围的馏分而不是分成单个化合物。近年来,人们就蒸馏的理论[3][4]和分馏柱的设计[5][6][7]做了不少工作,但没有突破性进展。

液-液萃取 液(液萃取是一种简便而使用广泛的分离技术。两个互不溶解(或者是很少

混溶)的液体为两相。在最简单的情况下,样品被溶解于一个液体(萃余液)中,它在分液漏斗中与另一液体(萃取剂)接触。为了增加两相之间的接触,可轻轻摇动分液漏斗,样品组分就在两相之间进行分配并达到平衡。理想情况下,一个组分大部分留在萃余液中,而另一组分则进入萃取剂,因此达到了分离。

萃取的实行基于溶质在两相中的分配系数不一样,分配系数可简单地定义为 $K_p = [A]_{\text{萃余液}} / [A]_{\text{萃取剂}}$,若两个溶质的分配系数不同,则它们就可分离,一个溶质的 K_p 大于 1 (留在萃余液中),另一个溶质的 K_p 小于 1 (萃入萃取剂中),此时更有利于分离。Morrison 和 Fresier[8] 撰写了一部关于液-液萃取的专著,对分析化学中的液-液萃取方面进行了详细的总结。Noel 和 Meloan[9] 将若干体系与现有的理论(如希耳布兰德溶解参数)之间建立了经验关系。

萃取方法可分成两大类,一类叫“完全萃取”,即要把一个样品中的某种物质全部除尽,通常这类分离是用错流过程完成的;另一类萃取可称为“选择性萃取”,因为它是用于比较困难的分离过程,如金属离子混合物的分离,这类分离一般是用逆流过程来完成的。许多可以用逆流液(液萃取分离的复杂混合物,现在可用色谱方法来分离了,色谱法比萃取法更快速而且简便。然而,就简单的错流萃取而言,还没有其它方法可代替它。

在二三十年前,萃取就应用于抗生素生产。近几年,在蛋白质的回收和分离上逐渐得到重视,因为它可以放大且易进行连续分离,而且容量大,选择性也好。但由于较大的蛋白质在典型的有机溶剂中的溶解度很小,限制了溶剂的选择范围,目前用于蛋白质分离的主要有两种体系,一是水溶液聚合物/盐体系[10][11](也有的用聚合物/聚合物),另一种是反向胶束体系[12][13]。

萃取也有一些不足之处,如使用的萃取剂价格大多较昂贵,有机溶剂较易挥发并且有一定的毒性。多级萃取过程也较繁琐。

膜分离技术 用天然或人工合成的高分子薄膜,以外界能量或化学位差为推动力,对双组份或多组份的溶质和溶剂进行分离、分级、提纯和富集的方法,统称为膜分离法。膜分离法可用于液相和气相分离。对于液相分离,可用于水溶液体系、非水溶液体系、水溶胶体系以及含有其他微粒的水溶液体系。膜分离法中,两相用膜分隔开,两相可以是液-液相,也可以是液-气相或是气-气相,为加快分离速度,有时在膜的两侧加上场,如电场或力场。在操作中,控制选择性的是膜而不是两相,由于膜上的孔径大小或是其上的功能基,使一些分子能透过膜,而另一些则不能。从 1960 年 Loeb 和 Sourirajan 用相转移工艺制备出第一张不对称醋酸纤维素反渗透膜以来,微滤、反渗透、超滤、透析、气体分离等技术得到迅速发展,许多膜分离技术实现了工业化生产,并得到广泛应用。进入 80 年代以后,尤其是 1989 年 Howaldt[14]等发明了纳滤膜,更大大拓宽了膜分离技术的应用范围。

长期以来,人们为了能探明膜透过现象,进行了大量深入的研究并提出了不少有关的理论,其中为众多学者所公认的著名理论有 Donnan 平衡理论、Nernst-Planck 扩散学说、Sollner 双电层理论和 Mayer-Scevers 学说。

在膜分离工程中,膜起了决定性作用。用于膜分离方法的膜有很多种,按膜的材料分,有无机膜(如沸石膜)、高分子膜、有机/无机复合膜(如填充沸石的聚合物膜)、有机膜、液膜等;按均一性分,有对称膜、不对称膜和复合膜;按孔径大小,有微滤膜、超滤膜、纳滤膜和反渗透膜。膜分离方法一般可按膜分离机理、膜分离推动力或膜的结构形态进行分类。通常比较直观的方法是按膜分离方法的推动力来进行分类,有以压力差、浓度差、温度差、电位差和化学反应为推动力的各种膜分离方法,如表 1.5 所示。在此基础上再按膜分离的机理、膜结构形态分类。如以压力差为推动力的方法中,按膜的孔径大小又可细分为微孔过滤、超过滤、反渗透或称“高滤”和气体分离等等。

表 1.5 膜分离方法(按推动力功能高分子膜的分类)(引自文献[1])

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库